

Methylcholanthrene 誘導 A 線維肉腫細胞由来 高転移クローン MH-02 の樹立とその性状に関する研究

第2報 MH-02 の血管内皮細胞及び基底膜コラーゲンへの付着性とその膜蛋白の解析

古川 勝久

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Establishment of High-metastatic Clone Derived from Methylcholanthrene Induced Murine Fibrosarcoma A and Characterization of the Properties

II. Cell Membrane Protein and Adhesive Properties of MH-02 to Endothelial Cells and Basal Membrane Collagen

Katsuhisa KOGAWA

Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. I. Urushizaki)

The adhesive properties of MH-02 clone to type IV collagen and endothelial cells were investigated in comparison with that of a low metastatic clone (ML-01). The number of MH-02 cells attached to either type IV collagen or calf pulmonary endothelial cell was significantly higher than that of ML-01 cells. The difference of adhesiveness between MH-02 and ML-01 cells was apparently obliterated by preincubation of these cells with antibody F(ab')₂ against MH-02 which had been preabsorbed with ML-01. In an attempt to clarify if the adhesive property of the MH-02 cell observed *in vitro* experiments was related to its enhanced metastatic potential, tumor cells were first incubated with the anti-MH-02 F(ab')₂ and injected into BALB/c mice via tail vein. Not only number of metastatic nodules in the lung but also the rate of tumor arrest measured by incorporation of ¹²⁵I-IUDR into the lung was substantially reduced by treatment with the antibody. The reduction of metastatic nodules or tumor arrest was not likely due to the tumoricidal effect of anti-MH-02 F(ab')₂ since neither cytotoxicity nor inhibition of tumor growth was noticed by *in vitro* experiment. The radiolabeled membrane components of MH-02 cells which reacted with this antibody were then analysed by SDS-PAGE and autoradiography and several bands (mainly of 95Kd and 180Kd) were identified. Physicochemical characterization of these membrane components is currently under investigation. (Received January 17, 1987 and accepted March 16, 1987)

Key words: Adhesive properties, High metastatic clone, Endothelial cells, Type IV collagen, Cell membrane

1 緒 言

本論文第1報においてはマウスメチルコラントレン誘導 A 線維肉腫由来高転移クローン MH-02 の樹立

と、その高転移性にかかわる血小板凝集能の意義について報告した。しかし、高転移、低転移クローンの転移能の差は抗血小板剤を用いた場合も完全には消失せず、転移能の差を血小板凝集能のみで説明することは

Abbreviations:

PRP: platelet rich plasma ¹²⁵I-IUDR: 5-[¹²⁵I]-Iodo-2'-deoxyuridine

出来なかった。つまり、血小板凝集を抑制した状態でも高転移クローンは低転移クローンよりも多く肺血管へ着床していた。

一般に流血中の腫瘍細胞が標的臓器に着床する場合、血小板などの血液成分以外に最初に接触するのは、血管内皮細胞または基底膜と考えられる。

そこで、第2報では、腫瘍細胞の血管内皮細胞及び基底膜成分である type IV コラーゲンへの付着性について両クローンの差異を検討した。ついで、その差異を検出する試みとして、高転移クローン MH-02 に対する抗体を作成し、それを用いて転移能と細胞表面の膜蛋白の変化についても検討した。さらに、*in vivo* における抗 MH-02 抗体の転移抑制の機序についても、あわせて検討した。

2 方 法

2.1 実験材料

腫瘍細胞としては、BALB/c マウス由来 Methylcholanthrene 誘導 A 線維肉腫 (Meth A) から第1報で樹立した高転移クローン MH-02、及び低転移クローン ML-01 を用いた。血管内皮細胞としては American Type Culture Collection より購入したウシ肺動脈内皮細胞由来 CPAE を用いた。RPMI1640 培養液は GIBCO 社、Eagle MEM 培養液 (MEM) は日水製薬、ウシ胎児血清 (FBS) は Flow Laboratories INC. からそれぞれ購入した。家兎補体は Cappel 社、Ethylene-diamine tetrahydroxy acetate (EDTA) は、片山化学工業、ペプシン (3,200 u/mg)、Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) は SIGMA 社より購入した。5-[¹²⁵I]Iodo-2'-deoxyuridine (¹²⁵I-IUDR) は Amersham UK 社、Na-¹²⁵I は第一ラジオアイソトープ社、Enzymobead™ reagent は Bio-Rad 社より購入した。DEAE-Sephacel, CN-Br activated Sepharose 4B, Sephadex G-25 及び G-75 は、Pharmacia 社より購入した。type IV コラーゲン溶液 (Cellmatrix type IV, 3 mg/ml, 純度 95% 以上) は新田ゼラチン社より購入した。

2.2 細胞培養

MH-02 及び ML-01 の培養は組織培養用フラスコ (Falcon # 3013) を用い、10% FBS, ペニシリン 100 units/ml, ストレプトマイシン 100 mg/l を含む RPMI1640 中で 37°C, 5% CO₂ の条件下で行なった。CPAE の培養は、15% FBS, ペニシリン 100 units/ml, ストレプトマイシン 100 mg/l を含む MEM 中で 37°C, 5% CO₂ の条件下で行なった。

2.3 腫瘍細胞による血小板凝集能の測定

腫瘍細胞の血小板凝集能の測定は、第1報において報告したように、腫瘍細胞浮遊液 (5×10⁵/10 µl) を、ヒト PRP に加えて、血小板凝集計 NKK, Hematracer 1 (二光バイオサイエンス社) により測定した。

2.4 抗 MH-02 抗体

2.4.1 抗 MH-02 抗体の作成

体重 2,500 g の白色家兎を用い、MH-02 を 5.0×10⁷/ml に調整したうえで、耳静脈から注入することを 2 日おきに 10 回反復し、さらに 14 日後に booster として、MH-02 5.0×10⁷/ml を同様に静注した。注射終了後 14 日目に心腔内より採血し、抗血清を得た。この抗血清を 40% 硫酸塩析後、0.0175 M sodium phosphate buffer (pH 6.3) で一昼夜透析し、同 buffer で平衡化した DEAE-Sephacel カラム (1.5×25 cm) に apply し、pass through fraction を IgG として得た。この IgG 分画を 0.5 M Sodium acetate buffer (pH 4.5) で一昼夜透析後、ペプシンを 0.5 mg/ml とするように加え、37°C で 24 時間インキュベートし、さらに Phosphate buffered saline (PBS) で一昼夜透析した。透析後 Sephadex G-75 カラム (1.5×50 cm) へ apply し、F(ab')₂ 分画を得た。F(ab')₂ 分画の濃縮はビスキングチューブ (サイズ: 16/32, Union Carbide Corporation 社) へ F(ab')₂ 分画を入れ、4°C にて Sephadex G-25 により水分を吸収して行なった。

2.4.2 抗 MH-02 抗体の ML-01 による吸収操作

抗 MH-02 抗体の F(ab')₂ を ML-01 により吸収した。吸収は F(ab')₂ 1 ml (15 mg/ml) に対して ML-01 (1×10⁷ 個) を浮遊させ 4°C で 30 分間インキュベートしたのち 2,100×g で 10 分間遠心し、上清を回収することで行なった。

以後の実験には以上の吸収操作を 4 回繰り返して得た抗体 F(ab')₂ を用いた。

2.5 腫瘍細胞の ¹²⁵I-IUDR による標識

Fidler の報告した方法¹⁾に従って、10% FBS 加 RPMI1640 中に MH-02 または ML-01 を 1.0×10⁵/ml となるように調整したのち、¹²⁵I-IUDR を 1.0 µCi/ml となるように加え、さらに 36 時間培養し、¹²⁵I-IUDR による標識を行なった。

2.6 MH-02 及び ML-01 の血管内皮細胞並びに

type IV コラーゲンに対する接着性の検討

CPAE を 2.0×10⁴/ml に 15% FBS 加 MEM で調整した後、12 well 組織培養用プレート (Costar # 3512) へ 2 ml ずつ分注した後 24 時間培養して、単層培養ブ

レートを作成した。Type IV コラーゲンプレートは、type IV コラーゲン溶液 (3.0 mg/ml) を蒸留水で10倍に希釈した後12 well 組織培養用プレート (Coster # 3512) へ0.5 ml/ずつ分注し、37°C 恒温器内で乾燥させて作成した。次に、 ^{125}I -IUDR 標識した MH-02, ML-01 を RPMI1640 で3回洗浄したのち $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ となるように調整し、CPAE プレート及び type IV コラーゲンプレートへ1 ml/well ずつ分注した。

分注後、200×g で5分間遠心し、細胞をプレートの底面へ付着させたのち、37°C、5%CO₂ の条件下で静置し一定時間後にそれぞれ Rotary shaker TAIYO R-II mini (大洋科学工業) にて100 r. p. m. で10秒間振とうし、未付着細胞を浮遊させてその上清を吸引した。RPMI1640 を1 ml/well に再び分注し、同様に振とうし上清を吸引することを3回繰り返す。未だプレートに付着している細胞を1N-NaOH 1 ml で溶解した。その後溶解液の放射活性を測定し、well に加えた細胞の放射活性を100%としこれに対する比率(%)で表した。

2.7 腫瘍細胞の肺着床率の検討

MH-02, ML-01 を ^{125}I -IUDR により ^{125}I 標識した後、3回洗浄し、 $1.0 \times 10^5/0.1 \text{ ml}$ となるように RPMI1640 にて調整して BALB/c マウス (1群3匹) の尾静脈より静注し、5分、15分、60分、24時間後に各々の群から肺及び脾臓を摘出した。この摘出臓器を70%エタノール液に浸し、12時間ごとに3回同液を交換した後、その放射活性を測定した。MH-02 及び ML-01、 1.0×10^5 個の放射活性をそれぞれ100%として肺に停滞した放射活性をこれに対する比率(%)で表した。

2.8 *In vivo* における人工肺転移能の検討

MH-02 及び ML-01 を RPMI1640 にて $1.0 \times 10^4/0.1 \text{ ml}$ となるように調整しマウス尾静脈より静注して14日後にマウスを屠殺し肺表面の転移巣数を双眼対物顕微鏡下で計測した。

2.9 腫瘍細胞膜蛋白の ^{125}I 標識

MH-02 及び ML-01、 2.0×10^7 個を PBS 1 ml に浮遊させ EnzymobeadTM reagent 200 μl 、1% β -D グルコース 200 μl 、Na- ^{125}I 1 mCi を加えて室温で30分間インキュベートした。次いでこれらの細胞を2 mM の PMSF を含んだ PBI (NaI 20.5 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g, H₂O 1,000 ml) で5回洗浄し反応を停止した。

2.10 ^{125}I 標識蛋白の可溶性

^{125}I 標識した腫瘍細胞 2×10^7 個を Triton Tris buffered Saline (0.15 M NaCl, 10 mM Tris

(hydroxymethyl)aminomethane, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1% Triton X-100, pH 7.6) 1 ml に浮遊させ、Sonicator model W225R (和研薬) を用い20 Watt, 3分間超音波処理したのち、10,000×g で30分間遠心し上清を回収した。

2.11 SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) と autoradiography

SDS-PAGE は大略 Fairbanks²⁾ の方法に従い、分離用ゲルの acrylamide 濃度を5.6%とし、1% SDS の存在下でスラブゲルによる電気泳動を行なった。SDS-PAGE 後、ゲルを濾紙にのせ、ゲルドライヤー model SE504 (Hoefer Scientific Instruments) にて乾燥し Kodak NR-5T フィルムへ密着させた後、-70°C deep freezer 内で3日間感光させることにより autoradiography を行なった。

2.12 統計学的検定法

統計学的検定は、F 検定により、比較する試料が等分散であるか否かを検定し、等分散である場合には、Student の t-test、等分散と認められない場合には Welch 法により行なった。

3 結 果

3.1 MH-02, ML-01 の血小板凝集能に対する抗 MH-02 F(ab')₂ の影響

第1報において、MH-02 が ML-01 にはみられない、二相性の血小板凝集を示すことを既に報告した。そこで抗 MH-02 F(ab')₂ の血小板凝集能に対する影響を検討した。結果を Fig. 1 に示したが、MH-02, ML-01 ともに、抗 MH-02 F(ab')₂ で処理してもその血小板凝集能に変化は認められなかった。

3.2 MH-02, ML-01 の血管内皮細胞及び

type IV コラーゲンに対する付着性の比較

腫瘍細胞が転移標的臓器に着床する場合に最初に接触するのは血管内皮細胞または基底膜と考えられる。そこで血管内皮細胞及び基底膜の主成分である type IV コラーゲンに対する MH-02, ML-01 の付着性について検討した。Fig. 2 は、MH-02, ML-01 血管内皮細胞 (CPAE) 及び type IV コラーゲンへの付着率を経時的に調べたものである。CPAE 及び type IV コラーゲン両者に対して、MH-02 は、ML-01 より高い付着率を示した。したがって、MH-02 が高転移性を発揮する要因の一つとして、血管壁への着床が亢進していることが考えられた。

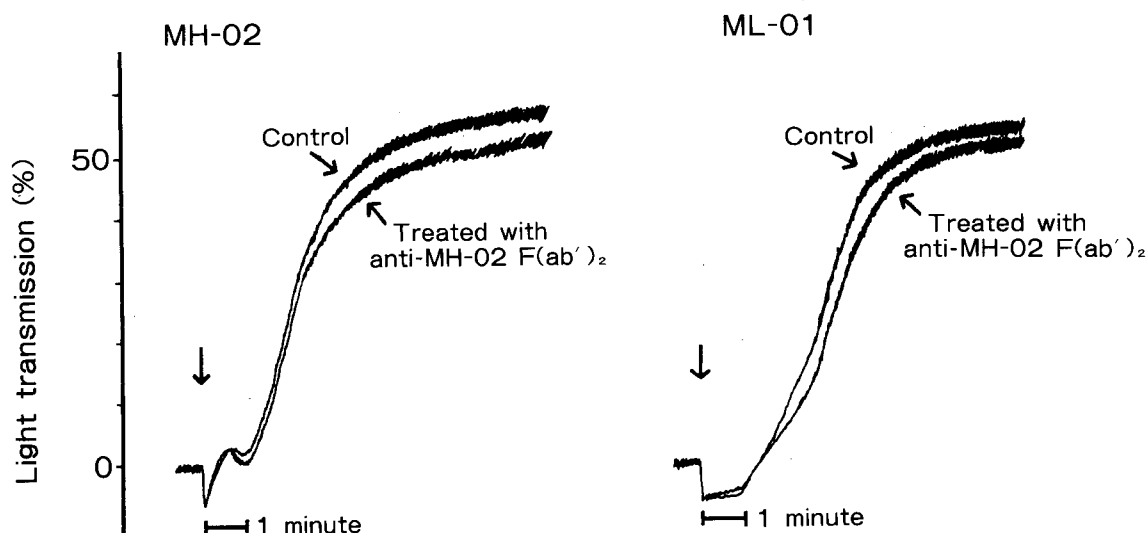


Fig. 1 Effect of anti-MH-02 $F(ab')_2$ on platelet aggregating activity of MH-02 and ML-01 cells. Cells were preincubated with anti-MH-02 $F(ab')_2$ (1.0mg/ml) at 37°C for 30 minutes, and then washed with FBS free RPMI 1640. Cells were resuspended at $5.0 \times 10^5/10\mu l$ and added to PRP as indicated by the arrow.

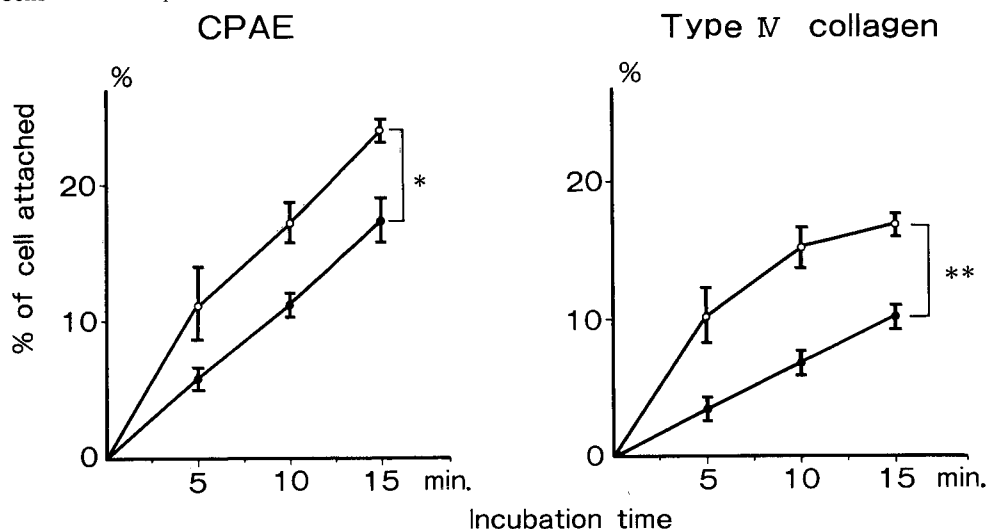


Fig. 2 Attachment of radiolabeled MH-02 and ML-01 cells to endothelial cell (CPAE) and type IV collagen *in vitro*.

Cells were radiolabeled with ^{125}I -IUDR, washed three times with RPMI1640 and resuspended to give the final concentration of 1.0×10^5 cells/ml in the same medium. Then cells were settled by centrifugation (200×g, 5 min) to the bottom of dishes, coated with type IV collagen or seeded with CPAE. The sample were agitated by a rotary shaker (100 r.p.m.) and washed three times with RPMI1640. Adhered cells were lysed with 1N NaOH and their radioactivities were counted. Values are shown as the means ± S. D. MH-02 cells (○); ML-01 cells (●). *: $p < 0.025$, **: $p < 0.005$.

3.3 MH-02, ML-01の血管内皮細胞及びtype IV コラーゲンへの付着性に対する抗MH-02 $F(ab')_2$ の影響

MH-02, ML-01を抗MH-02 $F(ab')_2$ によって処

理しそれらの血管内皮細胞またはtype IV コラーゲンへの付着性を非処理対照と比較した。Fig. 3にその結果を示した。抗体処理により、MH-02, ML-01の血管内皮細胞またはtype IV コラーゲンへの付着性は、いず

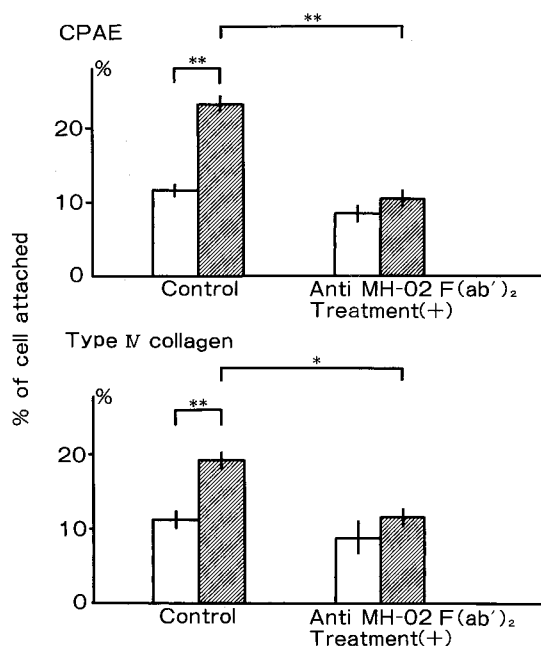


Fig. 3 Effect of anti-MH-02 F(ab')₂ on attachment of MH-02 and ML-01 cells to the endothelial cell or type IV collagen.

Cells were radiolabeled by ¹²⁵I-IUDR, washed three times with RPMI1640, and treated with anti-MH-02 F(ab')₂ (1.0 mg/ml) for 30 minutes. Then cells were washed and resuspended to give the final concentration of 1.0×10^5 cells/ml. ¹²⁵I-IUDR labeled cells were allowed to adhere for 15 minutes.

See Fig. 2 for details.

MH-02 cells (■); ML-01 cells (□).

*: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$.

れも低下したが、その程度はMH-02でより強く表現された。すなわち抗MH-02 F(ab')₂により、MH-02の付着率は、ML-01と同程度まで低下した。

3.4 抗MH-02 F(ab')₂の肺着床率及び人工肺転移に対する影響

3.4.1 抗MH-02 F(ab')₂の細胞傷害性と細胞増殖抑制効果の検討

次に、抗MH-02 F(ab')₂の*in vivo*における転移抑制効果の検討を行なったが、それに先立ち、まず*in vitro*で抗MH-02 F(ab')₂の細胞傷害性及び増殖抑制効果について検討した。0.1~3 mg/mlの抗MH-02 F(ab')₂と、33.3% (v/v)の家兎補体を加えたRPMI1640中に、MH-02、ML-01を 5.0×10^5 /mlに浮遊させ、37°Cで60分間インキュベートした。経時的に生細胞数をトリパンブルー法で計測することにより細胞傷害性を検討した。Fig. 4に示したように、抗

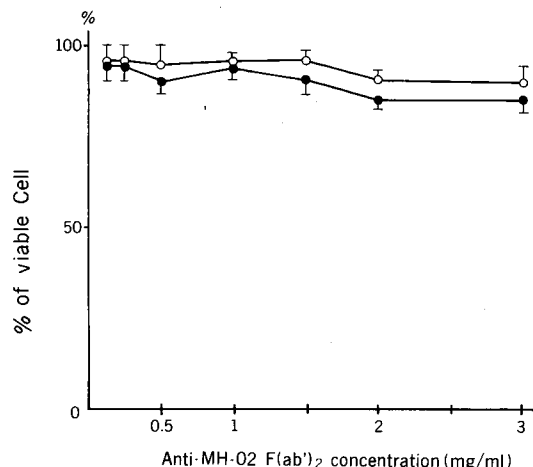


Fig. 4 Cytotoxic activity of anti-MH-02 F(ab')₂. Cells were incubated with anti-MH-02 F(ab')₂ (0.1~3.0 mg/ml) and rabbit complements (33.3% (v/v)) for 60 min at 37°C, and viable cells were counted by trypan blue dye exclusion method.

Assays were performed in triplicate. Each circle represents the mean value.

MH-02 cells (○); ML-01 cells (●).

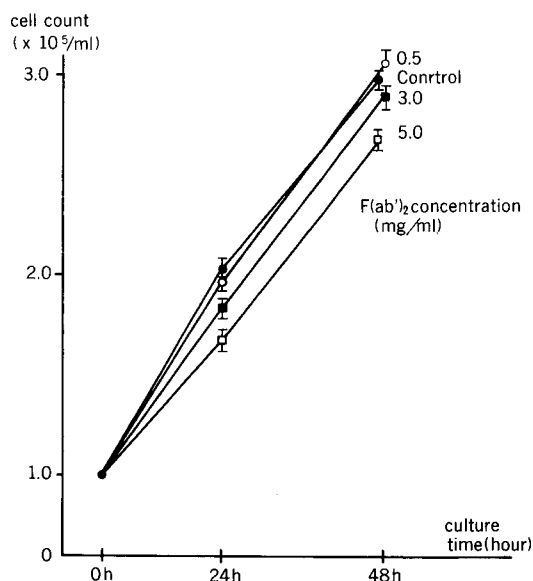


Fig. 5 Effect of anti-MH-02 F(ab')₂ on proliferation of MH-02.

Cells were cultured with a different concentrations of anti-MH-02 F(ab')₂ in RPMI1640 containing 10% (v/v) of FBS and rabbit complements, and viable cells were counted by the trypan blue dye exclusion method. Assays were performed in triplicate. Each point represents the mean value.

MH-02 F(ab')₂ は、いずれの細胞にも傷害性を有しなかった。また、Fig. 5 は同様の条件で、細胞増殖に与える抗 MH-02 F(ab')₂ の影響を検討したものであるが、やはり細胞増殖に対する影響は認められなかった。

3.4.2 MH-02, ML-01 の肺着床率に対する抗 MH-02 F(ab')₂ の影響

抗 MH-02 F(ab')₂ が、腫瘍細胞の血管への着床を *in vivo* において抑制するか否かを調べる目的で、MH-02, ML-01 を ¹²⁵I-IUDR により標識後、マウス尾静脈より静注し経時的に肺への着床率を検討した。

Fig. 6a にその結果を示すが、未処理 MH-02 は、静注 5 分後に 88.5% と極めて高い肺着床率を示し、以後

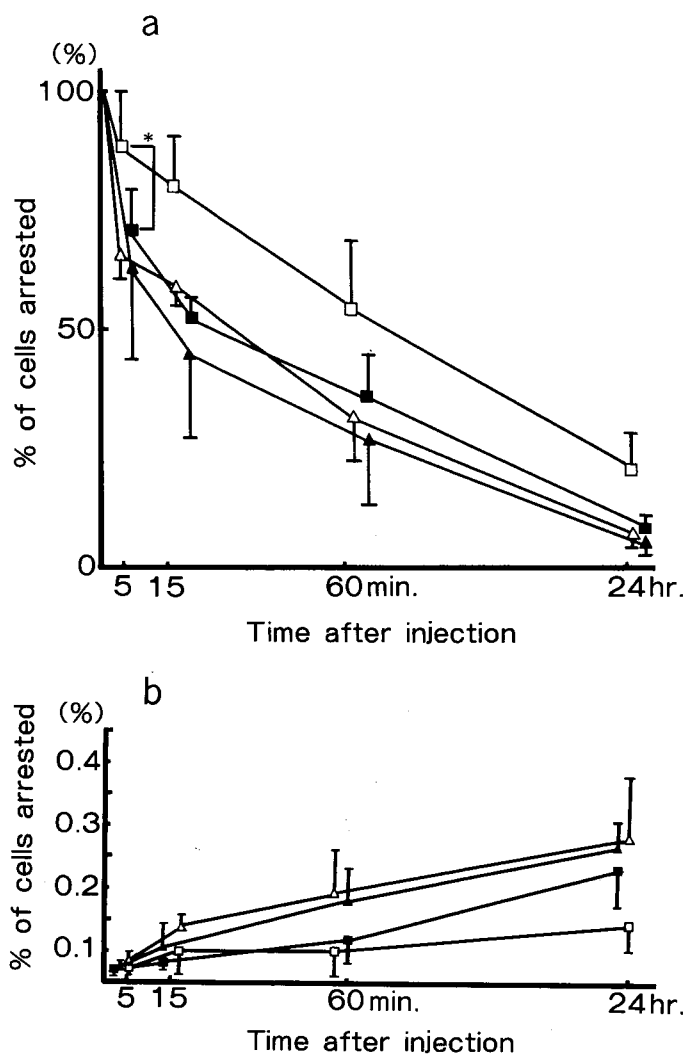


Fig. 6 Effect of anti-MH-02 F(ab')₂ on the arrest of radiolabeled MH-02 and ML-01 cells in the lung and spleen.

MH-02 and ML-01 cells were preincubated with anti-MH-02 F(ab')₂ (1.0 mg/ml) at 37°C for 30 minutes. Then cells were washed and cell suspensions ($1.0 \times 10^5/0.1$ ml) were injected into the tail vein of BALB/c mice. The animals were sacrificed and the lungs and spleens were removed. After treatment with 70% ethanol, radioactivities of the lungs and spleens were counted.

(a) Arrest in the lung. (b) Arrest in the spleen.

ML-01 cells (△); ML-01 cells treated with anti MH-02 F(ab')₂ (▲);

MH-02 cells (□); MH-02 cells treated with anti MH-02 F(ab')₂ (■). *: $p < 0.05$.

15分で80.0%, 60分で55.6%, 24時間で18.6%と他の3群と比較して最も肺着床率が高く, 高転移性は肺への着床率の高さを反映していることが明らかであった。一方抗 MH-02 F(ab')₂ 処理 MH-02 では, 5分後で66.9%, 15分後で52.5%, 60分後で45.5%, 24時間後で2.0%と未処理 MH-02 に比較して5分後の段階で既に肺着床率が低値を示した。すなわち, capillary bed への着床の極めて早期に抗 MH-02 F(ab')₂ の抑制効果が発揮されるものと考えられた。また ML-01 では MH-02 に比較して, 肺着床率は未処理, 処理群を問わず低値であった。同時に脾臓による腫瘍細胞の取り込みについても検討した(Fig. 6b)。MH-02 及び ML-01 の脾臓への取り込みは抗体処理の如何にかかわらず経時的な増加を示した。しかし, それらの相対的放射活性(投与放射活性に対する比)は0.5%以内で肺への取り込みに比べると極めて低値であった。また, MH-02 及び ML-01 のいずれについても抗体処理群と非処理群の間では有意差が認められずさらに ML-01 の取り込みは常に MH-02 のそれよりも高値であった。すなわち脾臓への放射活性の取り込みは肺で着床しなかった腫瘍細胞の集積であり, 抗体処理による影響は認められなかった。

以上のことから抗体処理による MH-02 の肺着床率の低下は脾臓での同細胞の特異的な捕捉による結果ではないと考えられた。

3.4.3 MH-02 及び ML-01 の肺転移形成能に対する抗 MH-02 F(ab')₂ の影響

肺着床率の差が実際に転移能の差に反映するか否かを検討した。Table 1 は, 腫瘍細胞を静注後14日目の肺表面の転移巣数を示す。ML-01 では, 未処理対象群が19.0±9.3個, 抗 MH-02 F(ab')₂ 処理群が23.4±10.4個と有意差はなかった。一方 MH-02 の未処理対象群は, 103.6±21.9個であるのに対して処理群は30.8±10.3個と, 著明な転移数の減少が認められた。

3.5 MH-02, ML-01 の表面膜蛋白の解析

これまでの *in vitro* 及び *in vivo* の結果から抗体 MH-02 F(ab')₂ は, 血管への着床に関与する膜蛋白を認識していると考えられた。

そこで, 抗 MH-02 F(ab')₂ を用いて, MH-02 及び ML-01 の細胞表面膜蛋白の解析を行なった。抗 MH-02 F(ab')₂ を CN-Br activated Sepharose 4B とカップリングさせ, ¹²⁵I 標識し可溶化した ML-01, MH-02 細胞表面膜蛋白と4℃で2時間インキュベートし, 吸着した蛋白を SDS-PAGE と autoradiography で解析した(Fig. 7)。MH-02 及び ML-01 の全細胞膜蛋白を比較すると両者に本質的な差は認められなかったが, ML-01 で4回吸収した抗 MH-02 F(ab')₂ が認識する MH-02 の膜蛋白は95 Kdalton, 180 Kdalton など数本のバンドに限られていた。つまり, これらのバンドは抗 MH-02 F(ab')₂ に特異的に反応する膜蛋白と考えられた。

Table 1 Antimetastatic effect of anti MH-02 F(ab')₂ on pulmonary metastasis of ML-01 and MH-02 cells.

Cells	Numbers of pulmonary metastatic nodules					Mean±S. D.
ML-01 Control	6,	20,	23,	15,	31,	19.0± 9.3
ML-01 F(ab') ₂ treatment	9,	16,	28,	33,	31,	23.4±10.4
MH-02 Control	74,	91,	104,	123,	126,	103.6±21.9
MH-02 F(ab') ₂ treatment	27,	19,	40,	43,	25,	30.8±10.3

ML-01 and MH-02 cells(0.5×10⁴/0.1ml) were injected into the tail vein of BALB/c mice after pre-treatment with anti-MH-02 F(ab')₂(1.0mg/ml) for 30 minutes.

*: N. S., **: p<0.001.

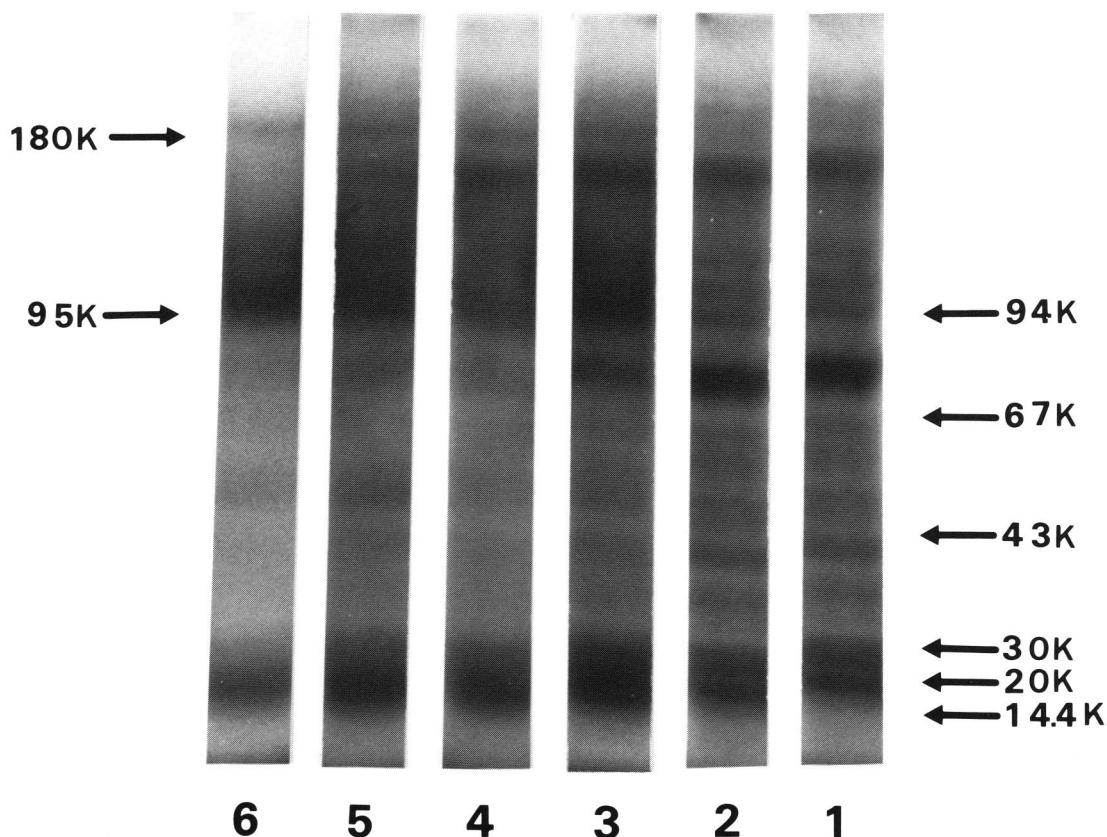


Fig. 7 Autoradiographs of SDS-PAGE pattern of ^{125}I -labeled ML-01 and MH-02 membrane proteins. Cell membrane proteins were radiolabeled with ^{125}I -Na and solubilized in Triton-Tris buffered saline. Solubilized membrane protein were incubated with Sepharose 4B coupled to anti-MH-02 F(ab')_2 which was preabsorbed by ML-01 cells. Then Sepharose 4B were washed with PBS five times. Membrane proteins bound to the Sepharose 4B were analysed on SDS-PAGE and autoradiography. Membrane proteins of ML-01; lane 1, Membrane proteins of MH-02; lane 2, Membrane proteins of MH-02, immunoprecipitated by anti-MH-02 F(ab')_2 which was preabsorbed once; lane 3, two times; lane 4, three times; lane 5, four times; lane 6.

4 考 案

転移の成立過程において、腫瘍細胞は、宿主側の種々の細胞や細胞外マトリックスと常に接触している。即ち転移の成立は、細胞表面における宿主側因子との接触を抜きにしては考えられず、細胞膜が転移の機構の解明に重要であることは当然といえる。

さて、本研究で用いた高転移クローン MH-02 及び低転移クローン ML-01 は、第 1 報で示したように異なった血小板凝集能を有し、それが転移能の違いを規定する一因となっていた。しかしそれ以外の機序が両者の転移能の違いに関与している可能性は否定できない。

そこで第 2 報では、腫瘍細胞の血管壁への付着性に

着目し、転移能との相関並びに付着機構について検討した。

一般に、流血中の腫瘍細胞はまず血管内皮細胞の表面へ付着し、ついで血管内皮細胞を退縮させて基底膜を露呈し組織へ侵入していくと考えられている^{3,4)}。つまり付着性の検討は、肺血管内皮細胞と基底膜物質を対象に行なうことが最も適切と考えられる。

そこで本研究ではウシ肺動脈内皮細胞由来 CPAE 細胞と基底膜の重要な構成成分である type IV コラーゲンについて高転移クローン MH-02、低転移クローン ML-01 の付着性の差異をまず検討した。結果は、CPAE 並びに type IV コラーゲンの両者に対して MH-02 は ML-01 よりも高い付着性を示した。しかも

その差は、経時的にみて、付着後5分には既に生じておりMH-02が生体内で極めて早期に血管内皮細胞、あるいはその基底膜へ付着することが推察された。

次に、この付着性の差異を生じる機構について、MH-02の細胞表面物質の変化に着目し検討した。

まず、高転移クローンMH-02の細胞表面に対するpolyclonalな抗体を作製しペプシン処理した後ML-01で吸収してMH-02により強く反応するF(ab')₂抗体を得た。次にこのF(ab')₂を用いて、MH-02並びにML-01の*in vitro*での血管内皮細胞またはtype IVコラーゲンに対する付着性の抑制効果を検討したところ、前者の付着性をより顕著に抑制した。したがってこのF(ab')₂はMH-02の付着機構を抑制する抗体を含んでいると考えられた。

そこで、抗MH-02 F(ab')₂が肺へのMH-02の着床を抑制するか否かを調べた。それに先立ち、抗MH-02 F(ab')₂の*in vitro*での細胞傷害性及び細胞増殖抑制作用を検討したところそれらの効果はいずれも認められなかった。そのうえで、実際に本F(ab')₂で前処理した腫瘍細胞を*in vitro*に投与したところMH-02の肺着床率は、ML-01のそれと同程度までに減少した。同時に脾臓への分布も測定したが抗MH-02 F(ab')₂で処理した細胞と未処理細胞とに差は認められなかった。したがって抗MH-02 F(ab')₂による肺転移の抑制効果は処理された腫瘍細胞が脾臓により多く捕捉されるための間接的な結果ではないと考えられた。また実際に形成された肺転移巣数をみても、抗MH-02 F(ab')₂による抑制効果は、ML-01では明確ではなかったものの、MH-02に対しては顕著であった。ただし、その抑制効果も完全なものでなく抗MH-02 F(ab')₂処理MH-02の転移数は、なおML-01に比べて高値であった。

次に¹²⁵IによりMH-02の細胞表面を標識し、界面活性剤で可溶化した後、あらかじめML-01により吸収した抗MH-02 F(ab')₂に吸着させ、その吸着した膜成分をSDS-PAGEとautoradiographyを用いて検討した。その結果、抗MH-02 F(ab')₂に強く反応する数本のバンド、(殊に95 Kdalton, 180 Kdaltonのバンドなど)が確認された。これらの膜蛋白は、分子量からみて、これまでに転移関連の細胞付着性蛋白として報告されている、フィブロネクチン³⁾(220 Kdalton 以下Kdと略す)、フィブロネクチン結合性蛋白⁶⁾(140 Kd)、ラミニン⁷⁾(1000 Kd)、ラミニンレセプター⁸⁾(67 Kd)、コラーゲンレセプター^{9,10)}(31 Kd, 120 Kd)、並びにMeth A細胞に報告¹¹⁾されている約20 Kdの血小板結合性蛋白の何れとも異なっていた。すなわちMH-02に存在する

新しいタイプの転移関連膜蛋白と考えられる。

これらの膜蛋白が血管内皮細胞やtype IVコラーゲンとの付着性にどのように対応するのか、また、どの膜蛋白が最も転移形成に関与しているのかなどの問題は極めて重要と考えられるが、今回の検討では明らかにはし得なかった。さらに、これらの膜蛋白がMeth Aに特異的なものかどうかについての検討も今後課題として残された。

転移に対する有効な治療及び予防法は、現在のところ残念ながら確立されていないがそのためには今後も転移の機構を究明することが不可欠と思われる。

5 結 論

Meth A由来高転移クローンMH-02の転移能と血管壁への付着性との関係を調べ以下の結果を得た。

1) 高転移クローンMH-02は、低転移クローンML-01に比較して、血管内皮細胞並びにtype IVコラーゲンに対して強い付着性を示した。

2) 家兎をMH-02で免疫し、得られた抗血清からIgG分画を精製し、ペプシン処理後ML-01で吸収することにより抗MH-02 F(ab')₂を作製した。

3) 抗MH-02 F(ab')₂は、MH-02の血小板凝集活性は抑制しなかった。

4) 抗MH-02 F(ab')₂は、MH-02の血管内皮細胞及びtype IVコラーゲンに対する付着を強く抑制した。

5) 抗MH-02 F(ab')₂は、MH-02の肺への転移を抑制したが、ML-01のそれは抑制しなかった。

6) 抗MH-02 F(ab')₂は、MH-02の肺への着床を有意に低下させるが、その低下はMH-02の肺への着床開始直後から既に認められた。

7) MH-02には、抗MH-02 F(ab')₂と免疫沈降する数種の膜蛋白(95 Kdalton, 180 Kdaltonなど)が認められた。

以上より、MH-02による高転移性の一部は、血管内皮細胞、type IVコラーゲンに対する高付着性により担われていることが明らかとなった。またその付着性には、細胞膜上の数種の膜蛋白(95 Kdalton, 180 Kdaltonなど)が関与すると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導並びに御校閲を頂いた漆崎一朗教授、新津洋司郎助教授に深謝いたします。また、ご協力いただきました当講座の諸先生に感謝いたします。

文 献

1. Fidler, I. J.: Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ^{125}I -5-Iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**, 773-782 (1970).
2. Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallack, D. F. H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617 (1971).
3. Sindelar, W. F., Tralka, T. S. and Ketcham, A. S.: Electron microscopic observations on formation of pulmonary metastasis. *J. Surg. Res.* **18**, 137-161 (1975).
4. Kramer, R. H. and Nicolson, G. L.: Interaction of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: A model for metastatic invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5704-5708 (1979).
5. Hynes, R. O. and Yamada, K. M.: Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.* **95**, 369-377 (1982).
6. Knudsen, K. A., Rao, P. E., Damsky, C. H. and Buck, C. A.: Membrane glycoproteins involved in cell-substratum adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6071-6075 (1981).
7. Rao, C. N., Margulies, I. M. K., Tralka, T. S., Terranova, V. P., Madri, J. A. and Liotta, L. A.: Isolation of a subunit of laminin and its role in molecular structure and tumor cell attachment. *J. Biol. Chem.* **257**, 9740-9744 (1982).
8. Rao, C. N., Barsky, S. H., Terranova, V. P. and Liotta, L. A.: Isolation of a tumor cell laminin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 804-808 (1983).
9. Mollenhaver, J. and Vonder Mark, K.: Isolation and characterization of a collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes. *EMBO J.* **2**, 45-50 (1983).
10. Neumeier, R., Josic, D. and Reutter, W.: Integral membrane antigens involved in cell-substratum adhesion of hepatocytes and hepatoma cells. *Exp. Cell Res.* **151**, 567-572 (1984).
11. 石垣聖史: 各種プロスタグランジンアナログの癌転移抑制作用に関する研究 —特に抗血小板作用との関連について— *札幌医誌* **52**, 295-308 (1986).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第4講座 古川勝久